

心臓血管手術・呼吸器外科手術術後バイオマーカーとしての Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-associated lipocalin の検討

浅見冬樹

新潟大学大学院医歯学総合研究科

呼吸循環外科学分野

(主任：林 純一教授)

An Examination of Lipocalin-2/Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin as A Perioperative Biomarker of Thoracic and Cardiovascular Surgery

Fuyuki ASAMI

Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Jun-ichi HAYASHI)

要 旨

侵襲や炎症の定量的指標としては一般的に CRP が用いられているが、CRP は遅延型急性反応物質であり、急性相反応を反映する指標として一般化され普及しているものはほとんどない。近年好中球から分泌される抗菌物質である Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) が尿管障害による急性腎障害時に上昇する報告があり、クレアチニン値よりも早期に上昇する腎障害のバイオマーカーとして注目されている。しかし、NGAL は心臓からも心不全や心筋炎の発症によって NGAL の産生が亢進するとの報告もあり、腎障害以外のバイオマーカーになりうる可能性が想定される。これらのことより筆者は心臓血管手術、呼吸器外科手術術後に血中濃度が上昇し、術後感染、手術侵襲や組織障害の定量的評価が可能ではないかと考え、動物実験および当科における心臓血管、呼吸器手術症例の NGAL 血中濃度を測定し検討した。ラットの開胸手術においては対照群に比べ明らかに血中 NGAL の上昇が早期からみられ、ラット心臓から培養した細胞に細菌の成分であるリポポリサッカライドおよびリポタイコ酸を添加すると急激な NGAL の発現亢進がみられた。また、当科で手術を行った患者の内臓手術、人工心肺使用手術（開心術群）(n = 13)、非人工心肺使用血管手術（非開心術群）(n = 24)、呼吸器外科手術 (n = 31) から術前、術当日、術後 1, 3, 6 日に採血し、血中 NGAL 濃度を測定したところ、術前の血中 NGAL 濃度は CRP や Cre 濃度と相関が見られ、術後の血中 NGAL 濃度は CRP よりも早期に上昇がみられた。しかし、今回検討した当科症例の上記 3 群間においては NGAL の上昇に有意差はなく、腎不全をはじめ、術後に重篤な合併症や感染症を生じた症例はなかったため、合併症との関連は検討できなかった。

Reprint requests to: Haruo HANAWA
Division of Cardiology
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器学分野
塙 晴雄

以上より、今回の臨床症例の検討では血中 NGAL 値の術式による差や合併症による差を明らかにすることはできなかったものの、心臓血管手術、呼吸器外科手術後に CRP よりも早期に血中濃度が上昇し、手術部位の重篤な細菌感染、臓器障害合併症などではさらに上昇する可能性が示唆された。

キーワード：手術侵襲、リポカリン、バイオマーカー、CRP、全身性炎症反応症候群、鉄

緒 言

侵襲や炎症の定量的指標として C 反応性蛋白 (CRP) が一般的に用いられているが¹⁾、CRP は急性反応物質であるものの、やや遅れてから血中濃度が上昇する²⁾。そのため、より早期に急性相反応を反映する指標となるマーカーの確立が、外科侵襲を受ける症例の管理において望まれている。敗血症や敗血症がなくとも人工心肺使用手術後に発現する全身性炎症反応症候群いわゆる SIRS は、侵襲に対応して免疫細胞が血中に放出した大量の炎症性サイトカインによって起こるとされ³⁾、多臓器不全 (MOF) などの原因ともなるため術後管理が問題となる重要な病態である。そのため、インターロイキン (IL)-6 などの炎症性サイトカイン濃度は手術侵襲や術後感染症に対する定量的評価のマーカーとして、近年、様々な検討がされてきた⁴⁾。Oka らは、合併症を起こした症例で、術後 2 日目の血中 IL-6 が有為に高く、術後の血中 IL-6 濃度は合併症の発生を予想するうえで有用な指標になると報告した⁵⁾。一方、Lannergard らは、術後の感染症症例で、IL-6 は CRP よりも早期に有意な上昇が見られたものの、IL-6 は個人差が大きく、その臨床的な意義に関しては限られるのではないかとしている⁶⁾。このように IL-6 や TNF などの血中サイトカイン濃度は、多臓器不全を未然に感知し、早期治療に繋がる検査法として期待されているが⁷⁾、未だ臨床の場では一般化されてはいない。

一方、Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) は、急性腎不全の早期に上昇するバイオマーカーとして、近年注目されるようになってきた⁸⁾⁹⁾。NGAL は、主として好中球に含まれる糖蛋白質であり、細菌の鉄利用を阻

害することにより増殖抑制作用を持つ抗菌物質である¹⁰⁾。炎症性サイトカインである IL-1 などにより誘導されることがわかっており¹¹⁾、また非感染炎症時にも鉄動態の変化に伴う鉄に対する防御機構の 1 つとして考えられ¹²⁾、その反応は早期より著しく発現する。好中球だけでなく、尿細管や、肺胞上皮細胞、肝細胞も NGAL の分泌にかかわっており¹¹⁾、尿細管障害による急性腎障害時に上昇するため、腎障害のバイオマーカーとして特に注目されている⁸⁾⁹⁾。また最近、心筋細胞からも NGAL が産生されていると報告され、心不全のバイオマーカーとしても有用性が報告されている¹³⁾。我々も、ラット自己免疫性心筋炎モデルにおいて、DNA microarray の検討から、NGAL が心筋炎の心筋細胞で急激に遺伝子発現が亢進する遺伝子の一つであることをみだし¹⁴⁾、さらに心臓局所だけではなく肝臓での発現も増加し NGAL 血中濃度が急激に上昇することを報告した¹⁵⁾。

これらのことから、我々は心臓血管手術などの術後に NGAL が大きく変動し、腎障害のバイオマーカーとしてだけでなく手術侵襲や術後感染症などのバイオマーカーにもなるのではないかと考え、今回動物実験ならびに臨床の心臓血管外科、呼吸器外科手術症例における血清 NGAL を経時的に測定し、NGAL のバイオマーカーとしての意義を検討した。

材料と方法

1. ラット開胸モデルの作成法

200 ~ 250g の雄 Lewis ラットをセボフルレンによる全身麻酔下に気管内挿管した。開胸群 (n = 4) は左開胸を加えたのち閉胸し、抜管し

た。対照群 (n = 4) は開閉胸に要する 10 分間程度放置したのち抜管した。術後 1, 2, 3, 4 日後に尾静脈より採血を行った。

2. ラット心臓からの非心筋細胞の培養と細菌成分による刺激

8 週齢の雄 Lewis ラットの両心室を無菌的に取り出し、血液を生理食塩水で十分洗い落として細かく刻んだ後、0.0075 % タイプ II コラゲナーゼ (Invitrogen, Tokyo, Japan) 入り 0.25 % トリプシン EDTA 溶液 (Invitrogen) 中で、37 °C、20 分間インキュベートし、茶こしを用いてすりつぶして細胞を分離した。その後、0.83 % NH₄Cl 入り 0.17 M Tris buffer で溶血した後、125 μm の金属篩いを通して壊死組織片を取り除いた後、直径 35-mm 穴の dish に 2 ml の RPMI1640 溶液 (10 % 非働化済み FBS, 100 unit/ml penicillin および 100 μg/ml streptomycin 入り) 中で 2 週間培養した。RPMI 溶液の交換は、いずれの場合も培養開始翌日に交換し、細胞が 80-90 % コンフルエントになるまで、その後 2-3 回/週交換した。細菌成分による刺激は、リポタイコ酸 (LTA) 10ng/ml, リポ多糖 (LPS) 10ng/ml の濃度になるようにそれぞれを添加して、0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24 時間後に細胞を採集した。

3. 定量的 RT-PCR

培養細胞の RNA を Trizol を用いて抽出し、2-5 μg の RNA からランダムプライマーとマウス Moloney leukemia virus 逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。NGAL と IL-1β の mRNA 絶対コピー数は、以前報告したプライマー¹⁵⁾¹⁶⁾、SYBR Premix Ex Taq (Takara, Otsu, Japan) とライトサイクラーにて測定し (10 分間 95 °C、次に 95 °C 10 秒、62 °C 10 秒、72 °C 13 秒を 45 サイクル)、ライトサイクラーソフトウエアを用いてスタンダードカーブから求めた¹⁷⁾。

4. 手術症例

当科において 2009 年 4 月から 11 月までに手術を行った患者の内、心臓手術、人工心肺使用手術

(開心術群) (n = 13)、非人工心肺使用血管手術 (非開心術群) (n = 24)、呼吸器外科手術 (n = 31) から術前、術当日、術後 1, 3, 6 日目に採血し、血清を採取した。

5. NGAL 血中濃度の測定

ヒトおよびラットの NGAL ELISA kit (BIO-PROTO Diagnostic, Denmark) を用いてヒトおよびラットの血清 NGAL 濃度を測定した。またヒトの同時期の血中 CRP、クレアチニン (Cre) 濃度と比較した。

6. 統計解析

定量的 RT-PCR で求めた値は平均±標準誤差で示した。統計解析は、one-way ANOVA と Bonferroni の多重比較 test を用い、p < 0.05 を有意とした。CRP、Cre、NGAL との関係は、回帰分析を行った。

結 果

1. ラット開胸手術による血中 NGAL 濃度

開胸手術により、ラットの血中 NGAL 濃度は、1 日後に有意にコントロールに比較し上昇していた。上昇のみられた血中 NGAL 濃度は 2 日後以降次第に減少した (図 1)。一方、開胸手術をせず麻酔のみをかけたコントロールラットはほとんど上昇がみられなかった。

2. 細菌成分による心臓培養細胞の NGAL および IL-1β の遺伝子発現の変化

図 2 に示す通りグラム陽性球菌・桿菌の細菌細胞表層成分である LTA およびグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分である LPS により、添加 2 時間後から急激に NGAL の遺伝子発現が上昇した。一方、NGAL は IL-1 によって発現が誘導されるとの報告があるが¹¹⁾、IL-1β も LTA および LPS によって添加後 0.5 時間頃から急激に遺伝子発現が上昇した。

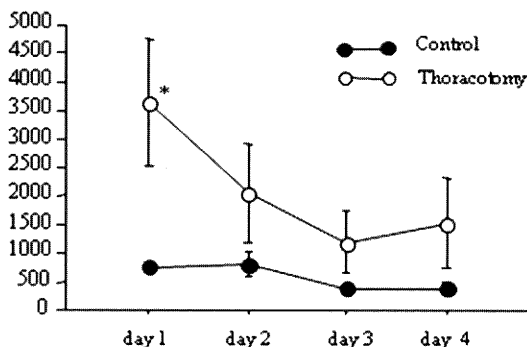


図1 ラットにおける開胸による血中 NGAL 濃度の変化

* p < 0.05

3. 術前の血中 NGAL と血中 CRP および血中 Cre との相関

NGAL は炎症性サイトカインにより誘導されることが知られており、また急性腎不全マーカーになるとの最近の報告があるので、術前の NGAL と血中 CRP および血中 Cre との相関を解析した(図3)。術前の血中 NGAL 濃度は、CRP ($r = 0.583$, $p < 0.0001$) および Cre ($r = 0.688$, $p < 0.0001$) と相関がみられた。

4. 周術期の血中 NGAL, CRP, Cre 濃度の経過

図4に示す通り血中 NGAL 濃度は術前に比べて術直後および1日後に有意に上昇し、3日後、6

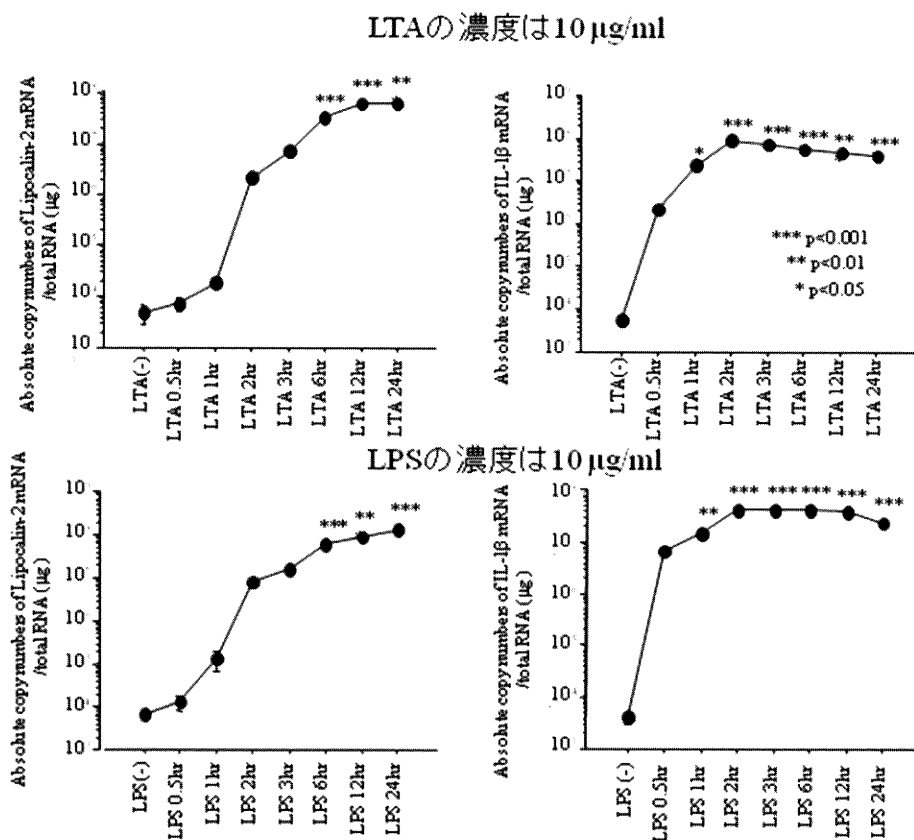


図2 LTA および LPS 添加による心臓培養細胞の IL-1β 遺伝子発現の変化

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

LTA, 10 ng/ml; LPS, 10 ng/ml

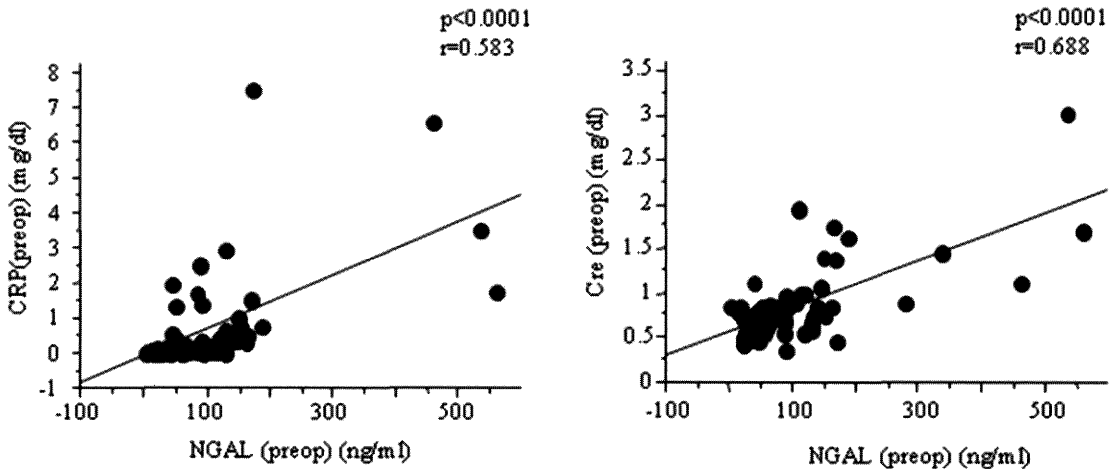


図3 術前の血中 NGAL 濃度と CRP 濃度および Cre 濃度の相関関係

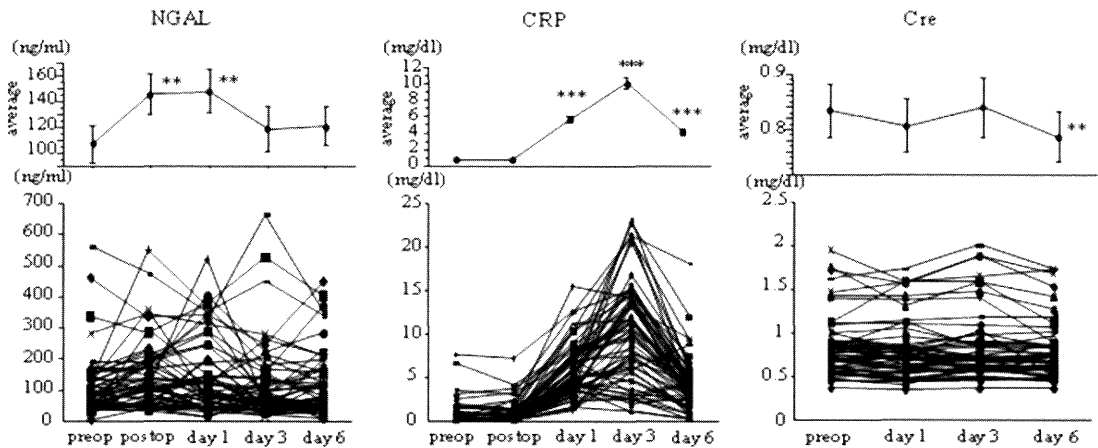


図4 周術期の血中 NGAL, CRP, Cre 濃度の変化

** p < 0.01, *** p < 0.001

日後に減少した。血中 CRP 濃度は術前に比べて 1 日後、3 日後、6 日後に有意に上昇し、ピークは 3 日後であった。NGAL の上昇は、CRP の上昇よりも早期にみられた。血中 Cre 濃度は今回の症例では、手術による上昇は見られなかった。

5. 術式による血中 NGAL 濃度の変化の比較

心臓手術、人工心肺使用手術（開心術群）（n = 13）、非人工心肺使用血管手術（非開心術群）（n = 24）、呼吸器外科手術（n = 31）の 3 種類の術式による血中 NGAL 濃度上昇の差を検討した。

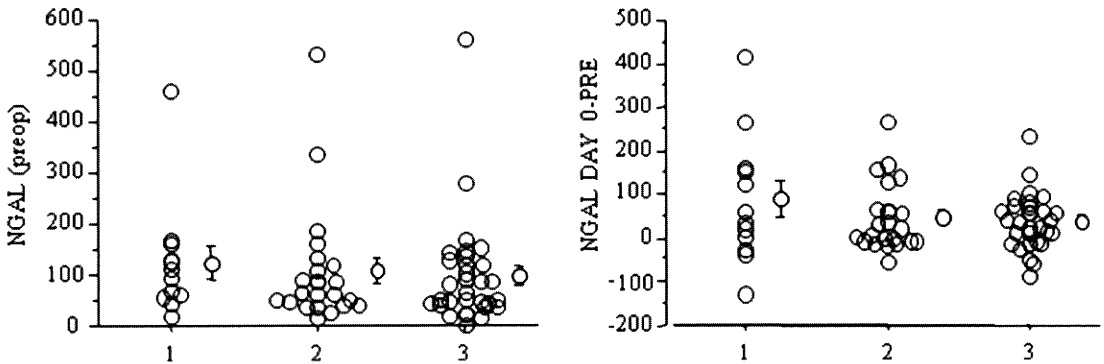


図5 術式による血中 NGAL の濃度および濃度変化の比較
1 : 開心術群, 2 : 非開心術群, 3 : 呼吸器外科手術群

しかし、手術侵襲が異なると予想される3つの術式の違いによる血中 NGAL 濃度上昇の有意な差はみられなかった (図5)。

考 察

CRP は炎症の定量的指標とされ、昔から臨床の場では広く用いられているマーカーである。IL-6 によって誘導されるとされているが¹⁸⁾、遅延型急性反応物質である。今回筆者のデータからも、手術侵襲によって血中 CRP 濃度は上昇したがそのピークは術後3日後と遅く、一方血中 NGAL 濃度は術直後および1日後から早期上昇がみられた。また NGAL は、CRP と Cre 値との相関がみられ、感染や腎障害の指標になりうることが示唆された。術後多臓器不全 (MOF) などの原因ともなる SIRS は、早期治療が重要であり、そのため早期指標の確立が重要である。このようなことから、血中 NGAL 濃度は早期に上昇し、感染や腎障害を感知するバイオマーカーとして有用になる可能性があるのではないかとわれわれは考えている。今回筆者が検討した症例は、術後重篤な合併症を起こした症例はなく、SIRS と考えられる症例はいなかった。しかし、ラットの実験で明らかであったように、開胸という侵襲だけで血中

NGAL 濃度は鋭敏かつ早期に上昇し、また細菌成分である LTA や LPS の刺激が心臓の培養細胞に対して急激に NGAL の遺伝子発現を誘導させたことから、細菌感染や外科侵襲によって早期に上昇する鋭敏なマーカーである可能性があるのではないかと思われ、その上昇が急激で持続するような場合には、術後重篤な感染や臓器傷害を起こすような SIRS を早期に感知しうる指標になりうるのではないかと思われる。以前我々が DNA マイクロアレイで調べた検討で¹⁴⁾、NGAL は心筋炎の心筋細胞で急激に発現が上昇した遺伝子の一つであったことを考えあわせると、今後症例を増やしてさらなる検討をする必要があると考える。

ところで、NGAL の作用であるが、様々な作用が想定されている¹²⁾。その中でも、抗菌作用についてはいろいろなデータから明らかとなっている¹⁹⁾。NGAL ノックアウトマウスは、大腸菌の感染に弱く、敗血症での致死率が高い²⁰⁾。NGAL の抗菌作用は、細菌の分泌した親鉄剤に NGAL が結合し、細菌の鉄の取り込みを阻害するためであることがわかっている¹⁰⁾。このことは、敗血症時に NGAL の血中濃度が上昇することが、生体にとって重要な防御反応であると考えられる。また、NGAL は鉄の細胞内外へ移動を制御するため、アポトーシスと密接に関係するとも考えられている²¹⁾。こ

のほかに、腎障害においては NGAL 投与によって虚血再還流傷害を抑制するとの報告もあり²²⁾、さらに組織のリモデリングに密接に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) と結合し、その作用を増強することもわかっている²³⁾。最近筆者らは、IL-1 や鉄を含有するフリーのヘムで急激に NGAL の発現が上昇することをみいだしたが (投稿中)、NGAL が生体の侵襲時に上昇する機序や NGAL の作用が明らかになれば、単なるバイオマーカーとしての意味だけでなく治療薬としてなりうる可能性もあるのではないかとと思われる。

結 語

血中 NGAL、CRP 濃度ともに手術侵襲に対して反応し上昇がみられるが、NGAL の方がより早期に上昇していた。血中 NGAL 濃度は、CRP および Cre 濃度と相関が見られ、グラム陽性および陰性の細菌成分は、心臓から得られた培養細胞に対して NGAL の遺伝子発現を強力に誘導した。したがって、血中 NGAL 濃度は、敗血症や SIRS に対する早期指標となりうる可能性があり、今後の検討が必要と考えられた。

謝 辞

本研究においてご指導を賜りました第一内科学教室の講師 塙 晴雄先生、同講師 鳥羽 健先生および保健学科 助教 太田好美先生に深謝致します。

文 献

- 1) Cole DS, Watts A, Scott - Coombes D and Avades T: Clinical utility of peri - operative C - reactive protein testing in general surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 90: 317 - 321, 2008.
- 2) Li JJ, Fang CH, Jiang H, Huang CX, Hui RT and Chen MZ: Time course of inflammatory response after renal artery stenting in patients with atherosclerotic renal stenosis. *Clin Chim Acta* 350: 115 - 121, 2004.
- 3) Hirai S: Systemic inflammatory response syndrome after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 9: 365 - 370, 2003.
- 4) Nishimoto N, Yoshizaki K, Tagoh H, Monden M, Kishimoto S, Hirano T and Kishimoto T: Elevation of serum interleukin 6 prior to acute phase proteins on the inflammation by surgical operation. *Clin Immunol Immunopathol* 50: 399 - 401, 1989.
- 5) Oka Y, Murata A, Nishijima J, Yasuda T, Hiraoka N, Ohmachi Y, Kitagawa K, Toda H and Tanaka N: Circulating interleukin 6 as a useful marker for predicting postoperative complications. *Cytokine* 4: 298 - 304, 1992.
- 6) Lannergard A, Hersio K, Larsson A, Pauksen K, Venge P, Stahle E and Friman G: Evaluation of laboratory markers for the detection of infections in open - heart surgery patients. *Scand J Infect Dis* 35: 121 - 126, 2003.
- 7) Furunaga A, Tsuboi H, Itoh H, Kawamura T, Minami Y, Gohra H, Katoh T, Fujimura Y and Esato K: Significance of systemic inflammatory response syndrome at cardiopulmonary bypass. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 44: 790 - 794, 1996.
- 8) Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J and Devarajan P: Neutrophil gelatinase - associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 365: 1231 - 1238., 2005.
- 9) Cruz DN, Ronco C and Katz N: Neutrophil gelatinase - associated lipocalin: a promising biomarker for detecting cardiac surgery - associated acute kidney injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 139: 1101 - 1106, 2010.
- 10) Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN and Strong RK: The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore - mediated iron acquisition. *Mol Cell*. 10: 1033 - 1043., 2002.
- 11) Cowland JB, Sorensen OE, Sehested M and Borregaard N: Neutrophil gelatinase - associated lipocalin is up - regulated in human epithelial

- cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol.* 171: 6630 - 6639., 2003.
- 12) Schmidt - Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P and Barasch J: Dual action of neutrophil gelatinase - associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 18: 407 - 413., 2007.
- 13) Yndestad A, Landro L, Ueland T, Dahl CP, Flo TH, Vinge LE, Espevik T, Froland SS, Husberg C, Christensen G, Dickstein K, Kjekshus J, Oie E, Gullestad L and Aukrust P: Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase - associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J* 30: 1229 - 1236, 2009.
- 14) Watanabe R, Hanawa H, Yoshida T, Ito M, Isoda M, Chang H, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Ding L, Hao K, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Gene expression profiles of cardiomyocytes in rat autoimmune myocarditis by DNA microarray and increase of regenerating gene family. *Transl Res.* 152: 119 - 127, 2008.
- 15) Ding L, Hanawa H, Ota Y, Hasegawa G, Hao K, Asami F, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Ogura M, Kodama M and Aizawa Y: Lipocalin - 2/neutrophil gelatinase - B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. *Circ J* 74: 523 - 530, 2010.
- 16) Liu H, Hanawa H, Yoshida T, Elnaggar R, Hayashi M, Watanabe R, Toba K, Yoshida K, Chang H, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Nakazawa M and Aizawa Y: Effect of hydrodynamics - based gene delivery of plasmid DNA encoding interleukin - 1 receptor antagonist - Ig for treatment of rat autoimmune myocarditis: possible mechanism for lymphocytes and noncardiac cells. *Circulation* 111: 1593 - 1600, 2005.
- 17) Hanawa H, Abe S, Hayashi M, Yoshida T, Yoshida K, Shiono T, Fuse K, Ito M, Tachikawa H, Kashimura T, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama S, Yamamoto T and Aizawa Y: Time course of gene expression in rat experimental autoimmune myocarditis. *Clin Sci (Lond)* 103: 623 - 632, 2002.
- 18) Majello B, Arcone R, Toniatti C and Ciliberto G: Constitutive and IL-6 - induced nuclear factors that interact with the human C - reactive protein promoter. *EMBO J* 9: 457 - 465, 1990.
- 19) Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S and Aderem A: Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432: 917 - 921, 2004.
- 20) Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You - Ten A, Wakeham A, Fong HE, Cheung CC and Mak TW: Lipocalin 2 - deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia - reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1834 - 1839, 2006.
- 21) Richardson DR: 24p3 and its receptor: dawn of a new iron age? *Cell* 123: 1175 - 1177, 2005.
- 22) Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt - Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P and Barasch J: Endocytic delivery of lipocalin - siderophore - iron complex rescues the kidney from ischemia - reperfusion injury. *J Clin Invest* 115: 610 - 621, 2005.
- 23) Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L and Moses MA: The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP - 9 and neutrophil gelatinase - associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP - 9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 276: 37258 - 37265, 2001.

(平成22年12月10日受付)